

THESIS

BONN

1969

EINFLUSS VON TESTOSTERON AUF DEN EINBAU
VON URIDIN-2-¹⁴C IN DIE RIBONUCLEINSÄURE
EINIGER ORGANE UNREIFER MÄNNLICHER
RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

ELKE JÄGER

aus

KÖLN

BONN 1969

EINFLUSS VON TESTOSTERON AUF DEN EINBAU
VON URIDIN-2-¹⁴C IN DIE RIBONUCLEINSÄURE
EINIGER ORGANE UNREIFER MÄNNLICHER
RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
ELKE JÄGER
aus
KÖLN

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. K.-O. Mosebach
Korreferent: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 3. 1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

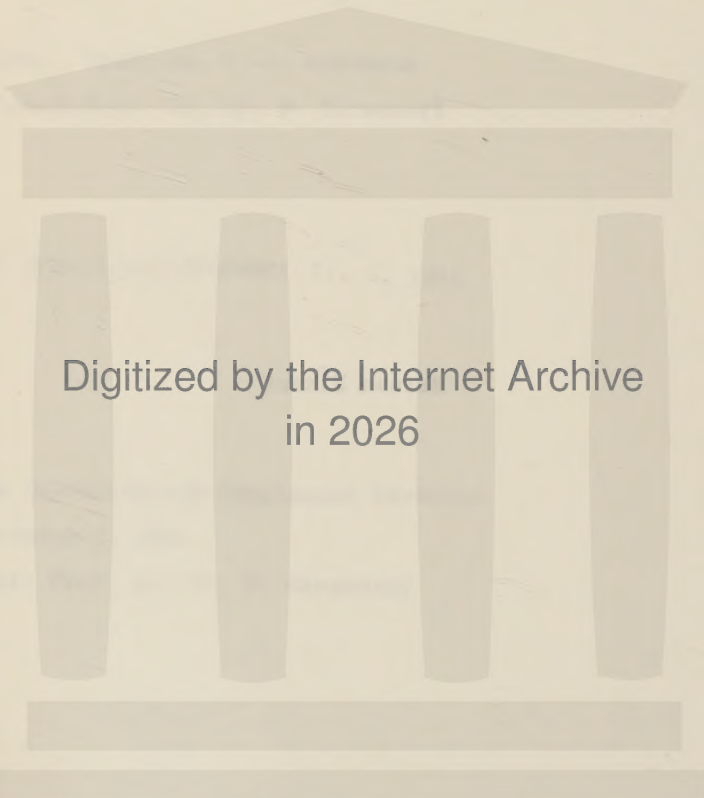
Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität

B o n n

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Teil	2
2. Teil	3
3. Teil	4
4. Teil	5
5. Teil	6
6. Teil	7
7. Teil	8
8. Teil	9
9. Teil	10
10. Teil	11
11. Teil	12
12. Teil	13
13. Teil	14
14. Teil	15
15. Teil	16
16. Teil	17
17. Teil	18
18. Teil	19
19. Teil	20
20. Teil	21
21. Teil	22
22. Teil	23
23. Teil	24
24. Teil	25
25. Teil	26
26. Teil	27
27. Teil	28
28. Teil	29
29. Teil	30
30. Teil	31
31. Teil	32
32. Teil	33
33. Teil	34
34. Teil	35
35. Teil	36
36. Teil	37
37. Teil	38
38. Teil	39
39. Teil	40
40. Teil	41
41. Teil	42
42. Teil	43
43. Teil	44
44. Teil	45
45. Teil	46
46. Teil	47
47. Teil	48
48. Teil	49
49. Teil	50
50. Teil	51
51. Teil	52
52. Teil	53
53. Teil	54
54. Teil	55
55. Teil	56
56. Teil	57
57. Teil	58
58. Teil	59
59. Teil	60
60. Teil	61
61. Teil	62
62. Teil	63
63. Teil	64
64. Teil	65
65. Teil	66
66. Teil	67
67. Teil	68
68. Teil	69
69. Teil	70
70. Teil	71
71. Teil	72
72. Teil	73
73. Teil	74
74. Teil	75
75. Teil	76
76. Teil	77
77. Teil	78
78. Teil	79
79. Teil	80
80. Teil	81
81. Teil	82
82. Teil	83
83. Teil	84
84. Teil	85
85. Teil	86
86. Teil	87
87. Teil	88
88. Teil	89
89. Teil	90
90. Teil	91
91. Teil	92
92. Teil	93
93. Teil	94
94. Teil	95
95. Teil	96
96. Teil	97
97. Teil	98
98. Teil	99
99. Teil	100

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
Einführung	7
Theoretischer Teil	8
Experimenteller Teil	13
A. Methode	13
1. Tiere und Injektionen	13
2. Aufarbeitung der Tiere	13
a) Organentnahme und Gewebezerkleinerung	13
b) Isolierung der Nucleinsäuren nach Ferguson und Wool	14
c) Isolierung und Fraktionierung der Ribonucleinsäure nach Georgiev	15
3. Mengenbestimmung der Nucleinsäuren	16
a) Bestimmung der Ribonucleinsäure	16
b) Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure	18
4. Radioaktivitätsbestimmung	19
a) Flüssig-Szintillator-Technik zur Akti- vitätsmessung der isolierten Nuclein- säuren	19
b) Flüssig-Szintillator-Technik nach Schö- niger-Verbrennung nichtfraktionierter Organe	22
B. Ergebnisse	25
1. Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der ^{14}C -Aufnahme in verschiedene Organe nach Injektion von Uridin- $2\text{-}^{14}\text{C}$	25
2. Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Uridin- $2\text{-}^{14}\text{C}$ in die RNA verschiedener Organe	34
a) Einfluß bei mehrtägiger Vorbehandlung	34
b) Initialer Einfluß	37
c) Zeitlicher Verlauf des Uridineinbaus in die Ribonucleinsäure	39

3. Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Uridin-2-14C in verschiedene Ribonucleinsäure-Fractionen	41
a) Einfluß bei mehrtägiger Vorbehandlung	42
b) Initialer Einfluß	44
C. Diskussion	47
Zusammenfassung	53
Literaturverzeichnis	

Einführung

Seit die Bedeutung der Hormone für den Organismus erkannt wurde, regulierend und koordinierend in den Stoffwechsel einzugreifen, steht die Frage ihres Wirkungsmechanismus auf molekularer Ebene mit im Vordergrund biochemischen Interesses. Das Bonner Institut für Physiologische Chemie befaßt sich besonders mit der Wirkungsweise der Steroidhormone. Während der letzten Jahre wurde in zunehmendem Maße auf frühzeitige Einflüsse verschiedener Hormone, insbesondere auch der Steroidhormone, auf den Nucleinsäurestoffwechsel aufmerksam gemacht. Dies führte zur Vorstellung einer Genaktivierung und Enzyminduktion als primär steuernde Reaktion dieser Hormone. Ziel der vorliegenden Arbeit in Fortsetzung früherer Untersuchungen ist, den Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in verschiedene RNA-Fractionen zu erfassen. Damit besteht die Aussicht, daß genaue Kenntnis der Eigenart solcher Einflüsse den Weg für weitere, vertiefte Einblicke in die Wirkungsmechanismen der Hormone weist.

Theoretischer Teil

Nach weitgehender Klärung der physiologischen Wirkungen der Hormone bleibt eine der klassischen Fragestellungen der Biochemie die nach dem Wirkungsmechanismus der Hormone auf molekularer Ebene. Aus der Untersuchung verschiedener Hormone läßt sich jedoch auch bis heute ein Wirkungsmechanismus nur indirekt über eine Fülle von Daten und Effekten beschreiben, die jeweils die eine oder andere der aufgestellten Hypothesen stützen, und es bleibt das Ziel weiterer Untersuchungen, die Vielfalt der Symptome auf die primär steuernden Reaktionen zurückzuführen.

Der Ausdruck "Hormon" wurde 1905 von Starling geprägt, um Stoffe zu bezeichnen, die wie das von Bayliss und Starling 1902 entdeckte Sekretin auf dem Blutweg andere Organe zur Tätigkeit anregen. Aber schon 1775 hatte Borden die Vorstellung, daß jedes Organ für den Körper wichtige Stoffe absondert, z.B. sollten die Keimdrüsen über einen solchen Stoff die Geschlechtsreife bewirken. 1849 gab Bertold den experimentellen Beweis dafür, indem er kastrierten Hähnen die Hoden an einer anderen Stelle einpflanzte und zeigen konnte, daß die Folgen der Kastration ausblieben.

1856 wies Brown-Sequard auf die Bedeutung der Nebenniere hin und Schiff im selben Jahr auf die der Schilddrüse. 1889 führten Mering und Minkowski den ersten experimentellen Pankreasdiabetes durch. Der Durchbruch der Hormonforschung zu internationaler Bedeutung gelang 1921 Banting und Best mit ihren Arbeiten über die Wirksamkeit des Insulins und seine Darstellung (Ammon und Dirscherl, 1960).

Das hiesige Institut befaßt sich seit etwa 10 Jahren mit der Untersuchung der Wirkungsweise des Testosterons. Testosteron als wirksamstes androgenes Steroid wurde 1935 erstmalig von Laqueur dargestellt, nachdem zuvor Butenandt 1931 Androsteron aus Männerharn isolieren konnte. Die physiologische Wirkung des Testosterons auf die Entwicklung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale und sein proteinanaboler Einfluß auf den Ge-

samtstoffwechsel sind inzwischen zum großen Teil beschrieben. In den letzten Jahren erschienen nun eine Reihe von Arbeiten, die sich mit den biochemischen Aspekten der Wirkungsweise des Testosterons befaßten, wobei auffällig war, daß besonders auch der Nucleinsäurestoffwechsel beeinflußt wird. Da 1961 Jakob und Monod die Hypothese formulierten, daß die Proteinsynthese genetisch über die messenger - Ribonucleinsäure (m-RNA) als Träger der in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) gespeicherten Information reguliert wird, stellt sich die Frage, inwieweit Testosteron primär steuernd in diesen Mechanismus eingreift, ob es andere Stoffwechselreaktionen primär beeinflußt oder ob es möglicherweise mehrere Wirkorte und Wirkungsmechanismen hat.

Zum Verständnis sei ein kurzer Überblick über die in den letzten Jahren diskutierten Möglichkeiten der Wirkungsweise eines Hormons gegeben (Villes, 1961 und Karlson, 1964):

1. Die zur Zeit attraktivste Theorie ist die von Karlson (1961) erstmals formulierte der Hormonwirkung als Genaktivierung und Enzyminduktion.

Ecdyson und Hormone mit ähnlichem Wirkungsmechanismus setzen primär am Genom an. Dort wird einer der Repressoren chemisch-physikalisch so verändert, daß er die DNA nicht mehr unterdrückt. Dies führt zur Stimulierung der m-RNA, die anschließend im Cytoplasma als Matrize für die Synthese verschiedener Proteine (z.B. Enzyme) dient.

Dieses Modell wurde gestützt von dem Experiment von Clever und Karlson (1960), die zeigten, daß Ecdyson an den Riesenchromosomen der Speicheldrüse von Chironomus tentans reversible morphologische Veränderungen, "puffs", auslöst. Nach Beerman (1952) sind "puffs" die aktiven Stellen des Genoms, d.h. Stellen, an denen eine rege RNA-Synthese stattfindet.

Sekeris (1964) untersuchte darauf eine von Ecdyson induzierte DOPA-Decarboxylase und wies mit Hilfe von Antimetaboliten nach, daß die Steigerung der Aktivität dieses Enzyms auf einer denovo-Synthese beruhte, die mit der Änderung des RNA-Stoffwechsels einherging.

Übrigens fanden schon Knox und Auerbach 1955, daß ein Hormon bestimmte Enzymsysteme aktiviert, indem es die Menge aktiver Enzymmoleküle erhöht. Sie wiesen nach, daß nach Injektion von Cortison die Menge der Tryptophanpyrrolase in der Rattenleber steigt.

2. Hormonwirkung durch Permeabilitätsänderung.

Bestimmte Peptidhormone wie Insulin und Vasopressin reagieren mit spezifischen Rezeptoren der Zellmembranen (Zellwand, Mitochondrien, subcelluläre Strukturen), wobei es primär zu einer Änderung der Permeabilität für bestimmte Substanzen im Zellinnern kommt. Damit wird die Umsatzrate eines Enzymsystems durch Änderung der Verfügbarkeit eines Substrates beeinflusst.

Es liegen inzwischen eine Reihe Beobachtungen vor, die für ein derartiges Phänomen sprechen:

Levine und Goldstein (1955) konnten zeigen, daß nach Insulininjektion die Glucoseaufnahme in die Muskelzelle steigt.

Kipnis und Noall (1958) berichteten, daß ebenso eine Steigerung des Aminosäuretransportes - unabhängig von der Glucoseaufnahme - vorhanden ist.

Eboué-Bouis et al. (1963) führten diese Experimente weiter und stellten fest, daß auch unter Puromycingabe, das die gesamte Proteinsynthese hemmt, der gesteigerte Transport von Glucose, D-Xylose und Aminosäuren unbeeinflusst bleibt.

3. Hormonwirkung als Enzymaktivierung.

Ein weiterer Weg, auf dem Hormone cellulläre Vorgänge beeinflussen könnten, wäre ein direkter Einfluß auf bestimmte Enzymsysteme, etwa indem präformierte inaktive Proteinmoleküle in aktive Moleküle mit voller enzymatischer Wirksamkeit überführt werden.

Rall and Sutherland (1957) beschrieben, daß Glucagon und Adrenalin die Cyclase beeinflussen, die 3', 5'-cyclisches Adenylmonophosphat bildet, das seinerseits für die Aktivierung der Phosphorylase in der Leber verantwortlich ist.

Villee (1961) nimmt eine Reaktion von Oestrogen mit einer Oestrogen abhängigen Transhydrogenase an, ebenfalls im Sinne einer Aktivierung, wodurch es in diesem System zur Umsatzsteigerung kommt.

4. Hormonwirkung über Freisetzung von Gewebs- und Neurohormonen. Räsänen (1961) und andere Autoren beobachteten, daß Steroidhormone bestimmte Gewebs- und Neurohormone freisetzen können. Sie halten diese für die eigentlichen Wirkstoffe.
5. Hormonwirkung durch allosterische Eiweißveränderung. Changeux (1964) diskutierte nach einem Modell der Monod'schen Schule, daß Hormone als niedermolekulare Verbindungen auch als allosterische Effektoren Enzymproteine aktivieren oder hemmen können. Nach seiner Auffassung spricht die Kinetik der Reaktion Enzym-Hormon bei den Versuchen von Villee (1961) eher für ein solches Modell als für eine direkte Bindung zwischen Enzym und Effektor.

Aber wie bereits gesagt, für ein allgemeingültiges Modell der Hormonwirkung, d.h. für das, was von dem Augenblick an geschieht, wo ein Hormon die Zelle erreicht bis zu seiner biochemischen Startreaktion fehlen noch die endgültigen Beweise.

Die vorgelegte Arbeit ist in Fortsetzung bisheriger Untersuchungen dieses Instituts entstanden, die helfen sollen, durch Verfolgung des zeitlichen Ablaufs der Testosteronwirkung festzustellen, ob das Hormon im Kern oder außerhalb zu wirken beginnt. Mosebach und Engels (1966) stellten fest, daß der Einbau von radioaktiv-markierten Vorstufen in die DNA unter Testosteron erheblich gesteigert ist. Dieser Effekt ist jedoch erst nach längerer Testosteronwirkung signifikant. Kurzzeiteffekte waren mit den angewandten Methoden nicht faßbar.

Bei den entsprechenden Versuchen dieser Arbeit über die Wirkung von Testosteron auf den RNA-Stoffwechsel sollte festgestellt werden, ob Effekte vorhanden sind, welcher Art die Vorzeichen sind (Hemmung oder Aktivierung) und ob ein Einfluß des Testosterons schon bei kurzfristiger einmaliger Hormoninjektion zu beob-

achten ist. Dabei wurden wie bei den bisherigen Versuchen des hiesigen Arbeitskreises möglichst physiologische Versuchsbedingungen zugrunde gelegt: in-vivo-Ansätze, physiologische Dosis, unreife statt kastrierter Tiere.

Experimenteller Teil

A. Methode

1. Tiere und Injektionen

Als Versuchstiere dienten unreife männliche Sprague-Dawley-Ratten gleichen Alters und mit weitgehend übereinstimmendem Gewicht. Je nach Versuchsanordnung wurden 15 bis 25 Tiere vom 25. bis 29. Lebenstag täglich um 18 Uhr bzw. bei Kurzzeitversuchen einmal eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn 100 μ g Testosteron in 0,2 ml Sesamöl oder reines Sesamöl (Kontrollen) subkutan unter die Bauchhaut injiziert. Am Abend vor Versuchsbeginn wurden die Tiere auf Hunger gesetzt. Am 30. Tag wurden 10 bis 20 Tiere - wieder mit übereinstimmendem Gewicht - ausgewählt und nach Zeitplan pro Ratte 4 bis 5,5 μ C Uridin-2-14C (radio chemical center, spez. Aktivität 36,9 mC/mM) in 0,2 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung subkutan unter die Bauchhaut injiziert. Die Kontrollen erhielten 0,2 ml der reinen NaCl-Lösung.

2. Aufarbeitung der Tiere

a) Organentnahme und Gewebezerkleinerung

3 Stunden nach Uridin-2-14C-Gabe wurden die Tiere unter Äthernarkose dekapitiert und sezirt, die herausgenommenen Organe gewogen und je nach Weiterverarbeitung entweder über P_2O_5 im Vakuum getrocknet (bei anschließender Schöniger-Verbrennung) oder mit aqua dest. bzw. Homogenisiermedium bei -18°C im Dewargefäß eingefroren.

Die Gewebezerkleinerung erfolgte in einem Gefriermikrotom (Kryotom der Firma WKF, Ernsthoven) in 10- μ -Schnitte. Organe mit hohem Fasergehalt (Vesikulardrüsen) wurden anschließend kurz homogenisiert (Homogenisator von Potter-Elvehjem).

b) Isolierung der Nucleinsäuren nach Ferguson und Wool (1962)

Vesikulardrüsen, Leber- und Thymusstücke wurden in Portionen zu 50 bis 70 mg zusammen eingefroren und anschließend geschnitten. Zur Fällung der Proteide einschließlich der Nucleoproteide wurden die Organschnitte 2 mal kurz (um Zersetzung der Nucleinsäuren zu vermeiden) mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure behandelt (2 ml auf etwa 50 mg Gewebe) und bei 3500 Upm 10 Minuten zentrifugiert (Laborzentrifuge "Christ"). Um die stark saure Trichloressigsäure zu eliminieren, mußte das Sediment 3 mal mit 96% Aethanol gewaschen werden. Zur Spaltung der Nucleoproteide wurde das Sediment anschließend mit 5 ml 10 % NaCl-Lösung und Neutralisation mit 0,05 n NaOH (Indikator: Phenolrot) 30 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und der Rückstand ein zweites Mal wie oben angegeben mit 10 % NaCl-Lösung extrahiert. Aus dem insgesamt 2 mal 5 ml NaCl-Extrakt ließen sich die Nucleinsäuren mit 25 ml 96 % Aethanol bei -20°C nach 12 Stunden ausfällen. Der Nucleinsäureniederschlag wurde abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes 2 mal mit je 3 ml 96 % Aethanol gewaschen.

Der Trennung der Ribonucleinsäure (RNA) von der Desoxyribonucleinsäure (DNA) diente das Verfahren nach Schmidt-Thannhauser (1945), wonach die Gesamtnucleinsäuren in 2 ml 0,1 n NaOH gelöst und zur Hydrolyse der RNA 24 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurden. Die nichthydrolysierte DNA konnte dann nach Zugabe von 0,2 ml 2 n HCl und unter Kühlung im Eiswasser ausgefällt und nach 1/2 Stunde abzentrifugiert werden. Der DNA-Niederschlag wurde in 3 bis 5 ml NaOH gelöst. Zur Mengenbestimmung und Radioaktivitätsmessung der Nucleinsäuren wurden Aliquots der sauren überstehenden RNA-Lösung und der alkalischen DNA-Lösung genommen und die entsprechenden Farbreaktionen durchgeführt bzw. die Zerfälle im "Tri-Carb-Counter" gemessen.

c) Isolierung und Fraktionierung der Ribonucleinsäure nach Georgiev (1963)

0°C-Fraktion

Die geschnittenen Organe (120 bis 150 mg) wurden mit 2 ml Homogenisiermedium (0,14 m NaCl, 0,01 % Bentonite und 0,01 m Trispuffer, pH 7) versetzt und zur Lösung der Membranen 0,2 ml einer 5,5 % Na-desoxycholat-Lösung zugegeben, sodaß die Suspension 0,5 % war. Darauf wurde diese Suspension mit gleichem Volumen 80 % Phenol emulgiert, bei 3°C (Eiswasserbad) 15 Minuten mit einem Vibrator (Firma Gerhardt, Bonn) geschüttelt und anschließend bei 25.000 Upm 20 Minuten mit der Ultrazentrifuge (WKF, Ernstthoven) zentrifugiert. Mit einer Kältemischung aus NaCl und Eis konnten Phenol- und Zwischenphase fraktioniert eingefroren werden, sodaß sich die darüberstehende wässrige Phase sauber abheben ließ. Die abgehobene wässrige Phase wurde zur Hemmung der Ribonuclease auf 0,5 % Na-dodecylsulfat gebracht und in Eis abgestellt. Die Phenolphase wurde verworfen. Diese Extraktionsprozedur erfolgte noch zwei Mal, indem der Zentrifugenrückstand diesmal mit 1 ml 80 % Phenol und dergleichen Menge Homogenisiermedium 5 Minuten bei 3°C geschüttelt und 15 Minuten bei 25.000 Upm zentrifugiert wurde. Die wässrigen Phasen konnten nach Zugabe von Na-dodecylsulfat zur ersten wässrigen Phase gegeben werden. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden durch zweimaliges Schütteln mit 80 % Phenol von den restlichen Proteinen befreit.

45°C-Fraktion

Der Rückstand der obigen Extraktion wurde nun 3 mal mit je 1 ml 80 % Phenol und 1 ml 0,14 m NaCl-Lösung exakt bei 45°C 5 Minuten geschüttelt, anschließend abgekühlt und bei 20.000 Upm 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und durch Schütteln mit Phenol enteiweißt.

85°C-Fraktion

Der Rückstand der 45°C-Fraktion wurde weiter 2 mal bei 85°C mit je 1 ml 80 % Phenol und 1 ml 0,14 m NaCl-Lösung extra-

hiert, jedoch in Gegenwart von Na-dodecylsulfat (wässrige Phase 0,5 %). Der weitere Arbeitsgang entsprach dem der 0°C- und 45°C-Fraktion.

Zur Fällung der Nucleinsäuren aus den vereinigten und entweißten Phasen wurde der Extrakt mit CH_3COOK auf pH 5,2 gebracht, das zweifache Volumen 96 % Aethanol zugesetzt (0°C-Fraktion: 10 ml; 45°C-Fraktion: 8 ml; 85°C-Fraktion: 5 ml) und 12 Stunden bei -20°C abgestellt. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

3. Mengenbestimmung der Nucleinsäuren

a) Bestimmung der Ribonucleinsäure

Zur Herstellung der Reagenzlösung wurden pro 1 ml einer Stammlösung von 33 mg FeCl_3 in 100 ml conc. HCl 10 mg Orcin gelöst. 1 ml dieser Reagenzlösung wurde mit 1 ml der zu untersuchenden RNA-Lösung 45 Minuten unter Rückfluß gekocht und das grüne Reaktionsprodukt vor der spektralphotometrischen Bestimmung mit 2 ml aqua dest. auf 4 ml aufgefüllt.

Als Leerwert diente 1 ml Reagenzlösung plus 1 ml 0,2 n HCl, in gleicher Weise wie oben beschrieben gekocht und auf 4 ml aufgefüllt.

Die Messung der Proben erfolgte bei 660 $\text{m}\mu$ im Spektralphotometer (Zeiss). Die Meßergebnisse wurden mit Hilfe einer Eichkurve ausgewertet (Abb. 1).

Für die Auswertung eines Probenpaares sei ein Beispiel angeführt.

Nach Extraktion der Gesamtnucleinsäuren und Trennung in DNA und RNA waren die RNA-Spaltprodukte zum Schluß in 2,2 ml Lösung enthalten. Von diesen 2,2 ml wurden 0,5 ml zur Radioaktivitätsbestimmung abpipettiert und die restlichen 1,7 ml mit 2 ml 0,2 n HCl auf 3,7 ml verdünnt, um eine geeignete Konzentration der RNA für die Farbreaktion einzustellen.

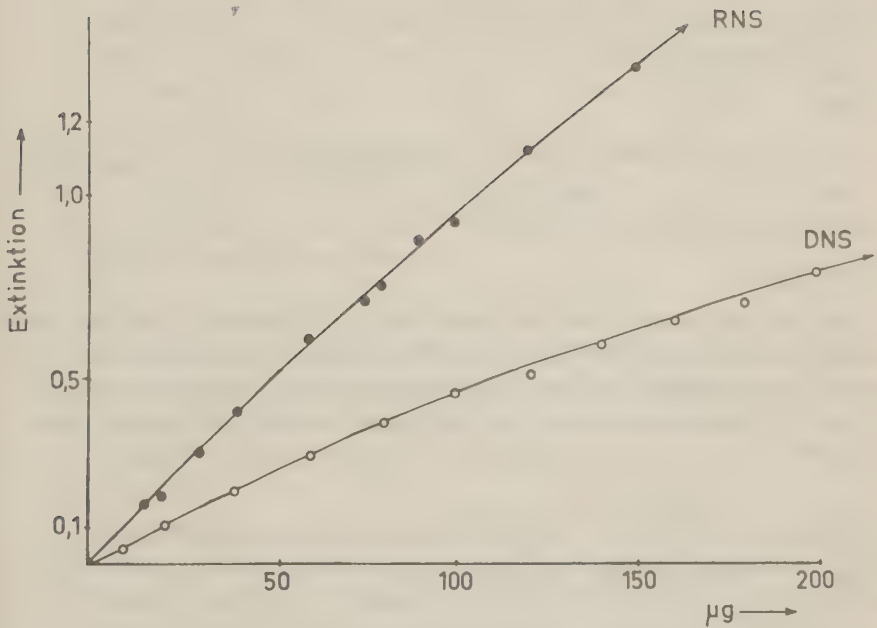


Abb. 1 DNA- und RNA-Eichkurven; Werte gemittelt aus je 3 verschiedenen Eichkurven. Die Ordinate gibt die optische Dichte gemessen bei $660 \text{ m}\mu$ als Funktion der DNA- bzw. RNA-Konzentration in μg an. Bei der DNA wurde die Diphenylamin-, bei der RNA die Orcinfarbreaktion durchgeführt.

Die Extinktionsbestimmung von 1 ml der verdünnten RNA-Lösung (Vesikulardrüsen; oT = ohne Testosteronvorbehandlung; mT = mit Testosteronvorbehandlung) ergab für die Proben

oT: 0,518

mT: 0,970

Diese Werte entsprachen einer RNA-Menge (Auswertung nach Eichkurve) von

oT: 51 μ g

mT: 101 μ g

In 3,7 ml RNA-Lösung waren dementsprechend

oT: 51 x 3,7 = 188,7 μ g

mT: 101 x 3,7 = 373,7 μ g

enthalten.

Die gleiche Menge RNA, die sich in 3,7 ml befand, war vor der Verdünnung in 1,7 ml enthalten. Zu Beginn der Analyse war die RNA in insgesamt 2,2 ml aufgenommen worden. Es ergeben sich also für die Gesamt-RNA der verwendeten Proben folgende Werte

$$\text{oT: } \frac{188,7 \times 2,2}{1,7} = 244,2 \mu\text{g}$$

$$\text{mT: } \frac{373,7 \times 2,2}{1,7} = 483,6 \mu\text{g}$$

Da die nach Georgiev extrahierte RNA der einzelnen Fraktionen nur in 1,5 ml NaOH aufgenommen wurde, mußte die Mengenbestimmung mit Aliquots der oben angegebenen Mengen durchgeführt werden. Bei der 0°C-Fraktion wurden 0,5 ml RNA-Lösung mit 0,5 ml 0,1 n NaOH verdünnt und mit 1 ml Orcinreagenzlösung, je 0,6 ml RNA-Lösung der 45°C- und 85°C-Fraktion ohne vorhergehende Verdünnung mit 0,6 ml Orcinreagenzlösung gekocht. Anschließend wurde mit 2 ml (0°C-Fraktion) bzw. 1,2 ml (45°C- und 85°C-Fraktion) aqua dest. verdünnt und gemessen.

b) Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure

Zur Herstellung der Reagenzlösung wurden 300 mg Diphenylamin in 20 ml Eisessig gelöst, 0,3 ml conc. H₂SO₄ und 0,1 ml einer Verdünnung von 1 Teil Acetaldehyd und 49 Teilen aqua dest. zugegeben.

2 ml dieser Reagenzlösung wurden zu 1 ml der zu untersuchenden

DNA-Lösung bzw. zu 1 ml 0,1 n NaOH zur Leerwertbestimmung gegeben, 17 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert und bei 595 m μ mit dem Spektralphotometer gemessen. Die Auswertung erfolgte nach Eichkurve (Abb. 1).

4. Radioaktivitätsbestimmung

- a) Flüssig-Szintillator-Technik zur Aktivitätsmessung der isolierten Nucleinsäuren

Alle Radioaktivitätsmessungen wurden in dem Flüssig-Szintillations-Spektrometer "Tri-Carb-Liquid-Szintillation-Spectrometer", Modell 3003 (Packard), durchgeführt. Zu Beginn seien kurz einige theoretische Anmerkungen über die Messung von β -Teilchen mit organischen Szintillatoren angeführt.

Die Energien der β -Teilchen werden von luminiszenzfähigen Substanzen absorbiert und als Lichtquanten (Szintillationen) wieder emittiert. Diese Lichtquanten lösen auf Photokathoden Photoelektronen aus, die durch Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (Multiplier) verstärkt werden, sodaß meßbare Ströme resultieren.

Um die an der Anode auftretenden Rauschimpulse, hervorgerufen durch thermische Elektronen, von den Signalimpulsen der Szintillationen zu unterscheiden, arbeitet der "Tri-Carb-Counter" nach der sogenannten Koinzidenzmethode, d.h. Stromstöße werden nur registriert, wenn auf 2 gegenüberstehenden Multipliern gleichzeitig Lichtquanten auftreffen. Das ist immer dann der Fall, wenn in der Probe ein radioaktiver Zerfall zu einem sich kugelförmig ausbreitenden Lichtblitz geführt hat. Das bei dieser Arbeit verwendete Szintillatormedium setzte sich aus 1000 ml Toluol, 4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 0,015 g POPOP [1,4-Di(2-(5-Phenyl-oxazolyl))-Benzol]7 zusammen. Um die wässrige Lösung messen zu können, wurden 600 ml der obigen Lösung mit 378 ml Aethanol absolut. als Lösungsvermittler gemischt.

Der verwendete "Tri-Carb-Counter" verfügt über 6 unabhängige Diskriminatoren und einen externen Standard, der nach der Messung automatisch eingeschwenkt werden kann. Die 6 Diskriminatoren erlauben die Einstellung von 3 nach Lage und Breite variierbaren Kanälen. Die ersten beiden Kanäle wurden bei den vorliegenden Messungen parallelgestellt, d.h. sowohl die beiden unteren als auch die beiden oberen Diskriminatoren waren Begrenzung für die gleichen Spannungsabfall-Werte. Außerdem wurden an beiden Kanälen die gleichen Verstärkungen angelegt. Der 3. Kanal diente der Messung des externen Standards. Seine Diskriminatoren und seine Verstärkung waren so eingestellt, daß praktisch keine ^{14}C -Impulse in ihm erfaßt wurden. Für diese Kanaleinstellung war die Aufstellung einer Eichkurve erforderlich, um bei der jeweiligen "quench"-Rate die Ausbeute und damit die tatsächliche Zerfallsrate (dpm statt cpm) bestimmen zu können.

Die Eichkurve wurde so aufgestellt, daß zu einer Reihe Eichproben mit konstanter ^{14}C -Aktivität unterschiedliche Mengen "quench"-Substanz (Aceton) gegeben wurden. Hierbei wurde das Volumen auf 20 ml gehalten. Abb. 2 zeigt die gefundene Eichkurve. Die Ordinate gibt die Ausbeuten wieder, die Abszisse die das Ausmaß des "quench"-Effektes widerspiegelnden Impulsraten im 3. Kanal. Die Einstellungen der Kanäle, insbesondere die des 3. Kanals, wurden solange variiert, bis bei möglichst guter ^{14}C -Ausbeute in den ersten beiden Kanälen eine weitgehend lineare Eichkurve entstanden war.

Die Messung der markierten Nucleinsäuren erfolgte so, daß 0,5 ml der wässrigen Nucleinsäurelösung zu 20 ml der angegebenen Szintillatorlösung in "vials" gegeben wurden. Nach Kühlung der Proben wurde 100 Minuten gemessen. Die Kontrollproben zur Bestimmung des "back-grounds" (Rauschimpulse, Höhen- und Umgebungsstrahlung) enthielten 20 ml der reinen Szintillatorlösung und 0,5 ml einer entsprechenden nicht radioaktiven wässrigen Lösung.

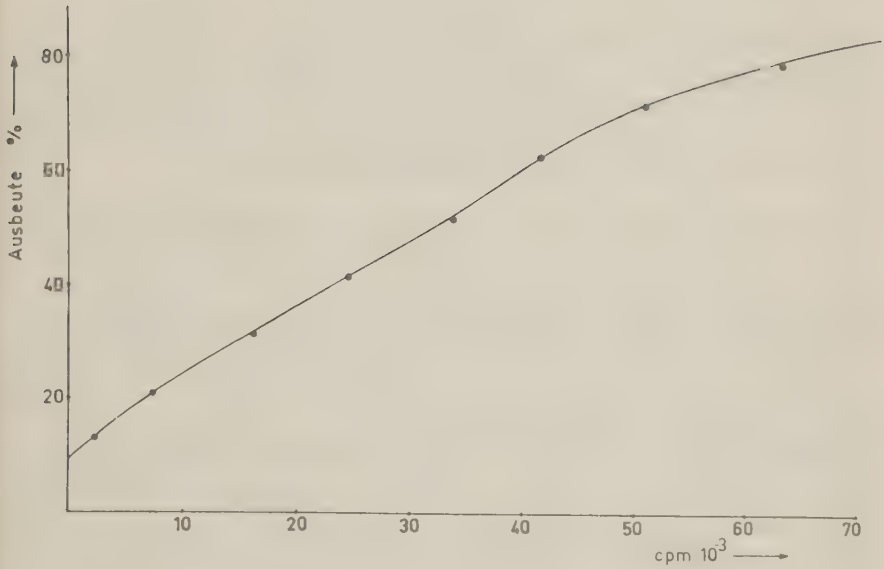


Abb. 2: Eichkurve zur Bestimmung der Ausbeute von ^{14}C mit Hilfe eines externen Standards. Abszissenwerte: Impulsrate im III. Kanal (externer Standard), Ordinatenwerte: ^{14}C -Ausbeute. Kanaleinstellungen: I. und II. Kanal 50 bis 850 bei "gain" 7 %, III. Kanal 300 bis 700 bei "gain" 2 %. Verwendete Apparatur: "Tri-Carb-Liquid-Szintillation-Spectrometer", Modell 3003 (Packard).

b) Flüssig-Szintillator-Technik nach Schöniger-Verbrennung (1955)
nichtfraktionierter Organe

Die Einwaage der über P_2O_5 getrockneten Organe erfolgte in Aluminiumschälchen mit Hilfe einer Mikrowaage (Mettler). Die abgewogene Menge (pro Verbrennung 2 bis 6 mg) wurde in kleine Papiertütchen aus aschefreiem Filterpapier (Blauband) gefüllt und mit einem Platin-Iridium-Netz, das sich an einem Verschlußstopfen der Schöniger-Gefäße befand, befestigt.

Die gründlich von allen organischen Verunreinigungen befreiten Gefäße wurden mit den entsprechenden Schliffstopfen und Küken verschlossen und zu Beginn der Analyse 5 Minuten auf Trockeneis gekühlt. Dann wurde aus einer Sauerstoffbombe ein starker O_2 -Strom zum Boden der Gefäße geleitet und die Gefäße wieder fest mit einem Schliffstopfen verschlossen. Nun wurde ein Filterpapiertütchen mit der zu analysierenden Substanz entzündet und der Stopfen, an dem das Tütchen befestigt war, schnell gegen den Verschlußstopfen des Schöniger-Gefäßes ausgetauscht, sodaß die Substanz im Gefäß zu CO_2 verbrannte. Um den nun im Gefäß herrschenden Überdruck zu reduzieren bzw. einen Unterdruck zum Einfüllen der Szintillatorlösung zu erzeugen, mußte der mit Klammern gesicherte Kolben wieder 15 Minuten auf Trockeneis im Dewargefäß gekühlt werden.

Die verwendete Szintillatorlösung setzte sich aus 9 Teilen der oben beschriebenen alkoholischen Szintillatorlösung und 1 Teil Aethanolamin zur Absorption des CO_2 zusammen. Diese Lösung mußte unmittelbar vor der Analyse angesetzt und auf Kühl-schranktemperatur gebracht werden.

Nach Abkühlung des Schönigergefäßes wurden 25 ml dieser Lösung in einen Scheidetrichter gegeben und nach Öffnen des Hahnküken zügig in das Gefäß gesogen. Damit alles aus der Verbrennung stammende CO_2 an Aethanolamin gebunden wurde, mußten die gut verschlossenen Gefäße 6 Stunden geschüttelt werden.

Zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität wurden 20 ml der eingesetzten 25 ml Szintillatorlösung in "vials" pipettiert und 20 Minuten im "Tri-Carb-Counter" gemessen. Zur "background"-Bestimmung diente eine Probe mit 20 ml der reinen Szintillatorlösung.

Im folgenden Abschnitt soll stellvertretend für alle übrigen Analysen ein vollständiges Versuchsprotokoll angeführt werden.

Zur Schöniger-Verbrennung wurden eingewogen:

oT: 2,905 mg (Vesikulardrüsen-Trockengewicht)

mT: 5,985 mg (" ")

(oT = Tiere ohne Testosteronvorbehandlung,

mT = Tiere mit Testosteronvorbehandlung)

Nach Radioaktivitätsmessung im "Tri-Carb-Counter" betrugen die Daten auf dem Meßstreifen:

	Leerwert	oT	mT
Probennummer	181	182	183
Zeit in 1/100 Minuten	2000	2000	2000
Impulsrate im 1. Kanal o.e.S.	1278	3249	6557
Impulsrate im 2. Kanal o.e.S.	1301	3348	6773
Impulsrate im 3. Kanal o.e.S.	115	124	115
Impulsrate im 1. Kanal m.e.S.	327578	324274	324168
Impulsrate im 2. Kanal m.e.S.	331422	328209	327970
Impulsrate im 3. Kanal m.e.S.	38123	31114	30345

(o.e.S. = ohne externen Standard,

m.e.S. = mit externem Standard, bezogen auf 1 Minute)

Für die Auswertung interessierten folgende Werte:

1. Die Probennummer; 2. die Zeit; 3. die Impulsrate im 1. Kanal (counts per 20 min) ohne eingefahrenen externen Standard, die die Zahl der registrierten Impulse, vermehrt um die Impulsrate des "background" ohne Berücksichtigung der Ausbeute angibt;
4. die Impulsrate im 3. Kanal, 1 Minute gemessen bei eingefahrenem externen Standard, die nach Auswertung mit Hilfe der gefundenen Eichkurve die Umrechnung von cpm (counts per minute)

auf dpm (desintegrations per minute) erlaubt.

Im vorliegenden Fall ergaben sich folgende Werte:

Impulsrate im 1. Kanal minus Impulsrate des "background"

$$oT: 3249 - 1278 = 1971 \text{ cp20min}$$

$$mT: 6557 - 1278 = 5279 \text{ cp20min}$$

Bezogen auf 1 Minute:

$$oT: 1971 : 20 = 98 \text{ cpm}$$

$$mT: 5279 : 20 = 264 \text{ cpm}$$

Die Ausbeuten betrugen:

$$oT: 49,5 \%$$

$$mT: 48 \%$$

Daraus läßt sich auf 100 % umrechnen:

$$oT: \frac{98 \times 100}{49,5} = 199 \text{ dpm}$$

$$mT: \frac{264 \times 100}{48} = 550 \text{ dpm}$$

Da nach der Schöniger-Verbrennung nur ein Aliquot (20 ml) der Gesamtaktivität in 25 ml ausgemessen wurde, errechnen sich die Gesamt-dpm zu:

$$oT: \frac{199 \times 25}{20} = 248,7 \text{ dpm}$$

$$mT: \frac{550 \times 25}{20} = 687,5 \text{ dpm}$$

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die dpm auf 1 mg Trockengewebe bezogen:

$$oT: 248,7 : 2,905 = 85,6 \text{ dpm/1mg}$$

$$mT: 687,5 : 5,985 = 114,9 \text{ dpm/1mg}$$

Der Effekt des Testosterons betrug bei diesem Probenpaar:

$$\frac{(114,9 - 85,6) \times 100}{85,6} = 34 \%$$

B. Ergebnisse

1. Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der ¹⁴C-Aufnahme in verschiedene Organe nach Injektion von Uridin-2-¹⁴C

Zunächst galt es, in einer möglichst einfachen Versuchsanordnung festzustellen, ob Testosteron unter den gewählten Bedingungen den Stoffwechsel von Uridin-2-¹⁴C überhaupt in irgendeiner Weise beeinflußt. Es wurde daher der Einfluß von Testosteron auf die Aufnahme von Uridin-2-¹⁴C bzw. auf die Konzentration der Radioaktivität in verschiedenen Organen (Vesikulardrüsen, Thymus, Muskulus levator ani, Niere und Leber) studiert, ohne Aufarbeitung der RNA oder bestimmter Uracil-haltiger Nucleotide. Mit dieser Versuchsanordnung war also keine Differenzierung möglich, in welcher Form das radioaktive Uridin in den Stoffwechsel eingegangen war, d.h. ob Testosteron die Konzentration der Bausteine, die Konzentration der Abbauprodukte oder den Einbau von Vorstufen in die RNA beeinflußt hatte.

Obwohl die Möglichkeit bestand, daß Testosteron eine Mengenänderung aller dieser Substanzen bewirkte, war es unwahrscheinlich, daß sich etwa vorhandene positive und negative Effekte bei Bestimmung der Gesamtaktivität gerade gegenseitig aufheben würden. Es mußte aber damit gerechnet werden, daß ein bei dieser Versuchsanordnung unter dem Einfluß von Testosteron gefundener Effekt auf nur eine der Uracil-haltigen Fraktionen zurückzuführen war, sodaß bei späterer Isolierung einer anderen Uracil-haltigen Fraktion gerade diese keine veränderte Stoffwechsellage zeigte.

Da aufgrund früherer Erfahrungen sowohl Größe als auch Richtung eines Effektes von der Versuchsdauer, speziell auch von der Zeitdauer zwischen Injektion einer radioaktiven Substanz und Entnahme des Organs abhängig sein kann, wurde eine Zeitkurve aufgestellt. Neben der Feststellung der Eigenart einer solchen Verlaufskurve sollte auch ein Anhaltspunkt gefunden werden, zu

welchem Zeitpunkt ein vorhandener Effekt am deutlichsten ausgeprägt ist, um sich bei späteren Versuchen mit isolierter Betrachtung der RNA auf diese voraussichtlich günstigste Zeit zur Sektion der Tiere konzentrieren zu können.

Es wurden insgesamt 4 Versuchsserien durchgeführt. Der Einfluß von Testosteron auf das Vesikulardrüsen-Frischgewicht spiegelt sich in Tabelle 1 wider.

Tab. 1: Einfluß von Testosteron auf das Vesikulardrüsen-Frischgewicht unreifer Ratten nach 5 tägiger Vorbehandlung. Die Tiere erhielten vom 25. bis 29. Lebenstag je $100\mu\text{g}$ Testosteron in 0,2 ml Sesamöl bzw. reines Sesamöl (Kontrollen).

	oT	mT
Frischgewicht	13,67	23,03
in mg	10,03	34,45
	15,05	28,00
	10,35	47,00
	12,24	47,75
	14,10	27,98
	11,80	36,42
	10,78	33,31
	9,61	42,68
	10,48	37,78
	8,90	35,46
	11,89	35,52
	9,95	24,55
	9,55	26,05
	11,85	27,36
	15,35	17,93
Streuung	$11,60 \pm 2,02$	$32,83 \pm 8,50$
t-Wert	9,738	

Der t-Test ergab, daß Testosteron bei 5 tägiger Vorbehandlung das Vesikulardrüsengewicht unreifer Ratten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ erhöht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Zeitkurven, die sich auf ein bestimmtes Organ beziehen, erwies sich als undurchführbar, da das eingesetzte Tiermaterial trotz gleichen Alters und gleicher Rasse bei den verschiedenen Versuchsserien sehr unterschiedliche Körperdurchschnittsgewichte hatte. Beim ersten Versuch betrug dieses beispielsweise 52 g, beim zweiten 71 g. Somit war die pro Tier applizierte Radioaktivität, bezogen auf das Körpergewicht, beim ersten Versuch größer als beim zweiten, da bei jedem Versuch 50 μ c Uridin-2-14C eingesetzt wurde, das dann wie beschrieben auf 10 Tiere verteilt wurde.

Um die verschiedenen Kurvenbilder von Vesikulardrüsen und Thymus in den ersten Versuchen (Abb. 3 und 5), bei denen verschiedene Sektionszeiten benutzt wurden, eventuell koordinieren bzw. erklären zu können, wurden in einem weiteren Versuch (Abb. 7) bei Thymus und Vesikulardrüsen 1/2-stündige Abstände zwischen den Sektionen je eines Tierpaares gewählt. Auch hier zeigte sich eine ausgesprochene Unruhe im Kurvenbild. Neben den sicher vorhandenen biologischen Schwankungen im Stoffwechsel der einzelnen Tiere, die eigentlich eine Zusammenfassung mehrerer Organe für je einen Punkt der Zeitkurve erforderlich machten, könnten sich auch kleine Abweichungen beim Applizieren der Radioaktivität und bei den kurzen Zeiten eine unterschiedliche Resorptionsgeschwindigkeit auswirken.

Um Mängel der Analysentechnik auszuschließen wurden, abgesehen von vorangehenden Versuchen mit Eichpräparaten, Stücke genügend großer Organe wiederholt verbrannt. Nachstehende Tabelle (Tab.2) zeigt die Werte in dpm/mg Organ (Trockengewicht), die 2 getrennten Analysen desselben Thymus bei verschiedenen Sektionszeiten nach Schöniger-Verbrennung entstammen.

Tab. 2: Werte nach Schöniger-Verbrennung in dpm/mg Organ (Trockengewicht), die 2 getrennten Analysen desselben Thymus bei verschiedenen Sektionszeiten entstammen.

oT		mT	
1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
124	134	111	110
114	122	142	144
134	129	80	106
112	104	138	130
118	145	114	110
212	216	116	118
129	138	88	88
107	108	109	113

Die Zeitkurven von 3 Versuchen sind in Abbildung 3 bis 7 enthalten. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt in einem gesonderten Teil.

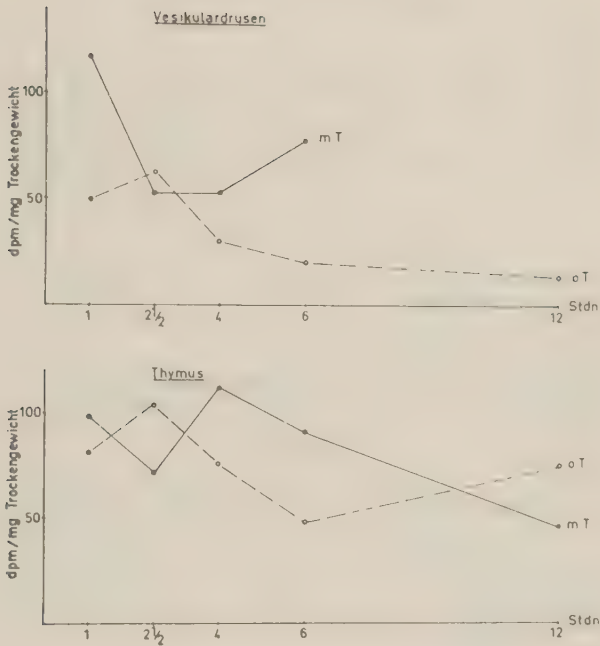


Abb. 3: Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der ^{14}C -Aufnahme in Vesikulardrüsen und Thymus. Vorbehandlung der Tiere 5 Tage mit je 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl bzw. mit reinem Sesamöl (Kontrollen). Am 6. Tag Injektion von 4,5 μC Uridin-2- ^{14}C in 0,2 ml physiol. Kochsalzlösung pro Tier. Durchschnittsgewicht der 10 eingesetzten Tiere 52 g. oT = Tiere ohne Testosteronvorbehandlung; mT = Tiere mit Testosteronvorbehandlung.

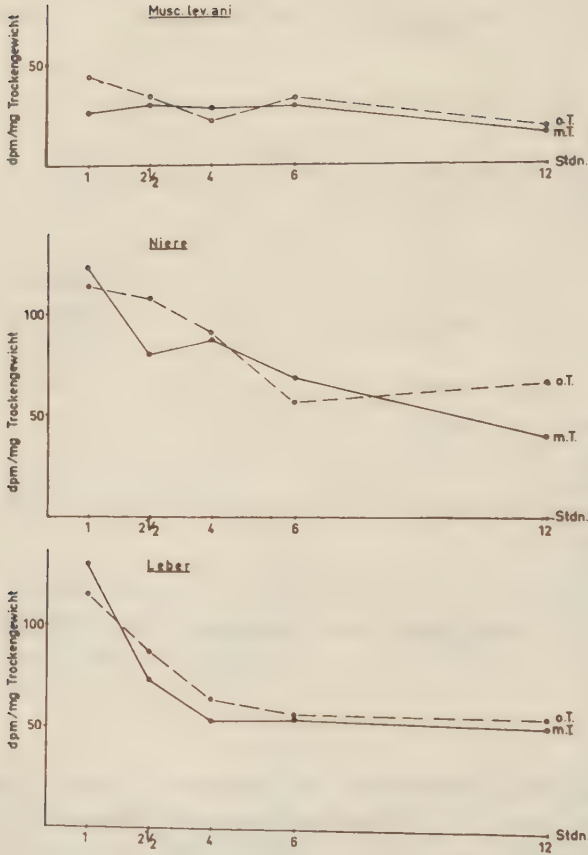


Abb. 4: Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der ^{14}C -Aufnahme in Muskulus levator ani, Niere und Leber; Vorbehandlung und Gewicht der Tiere siehe Abb. 3.

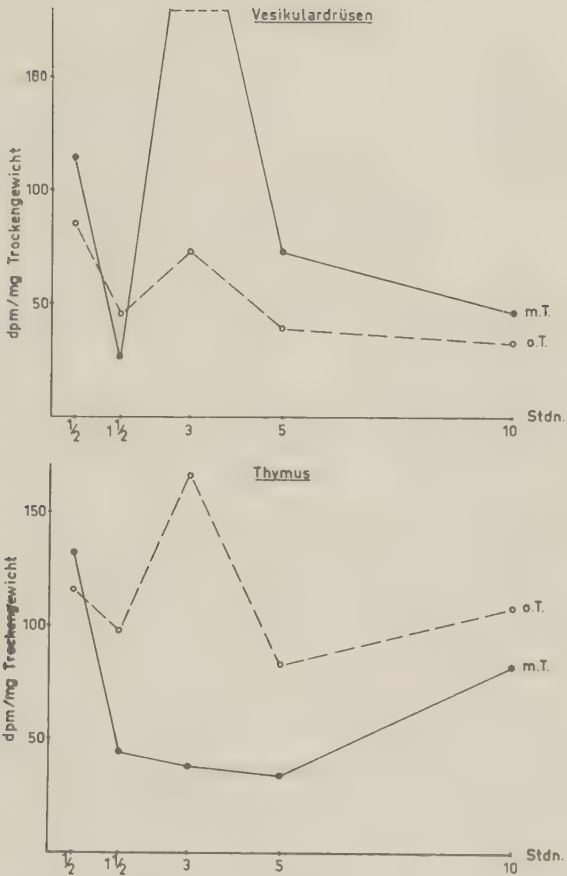


Abb. 5: siehe Abb. 3; Durchschnittsgewicht der eingesetzten Tiere 71 g; abweichende Zeitintervalle

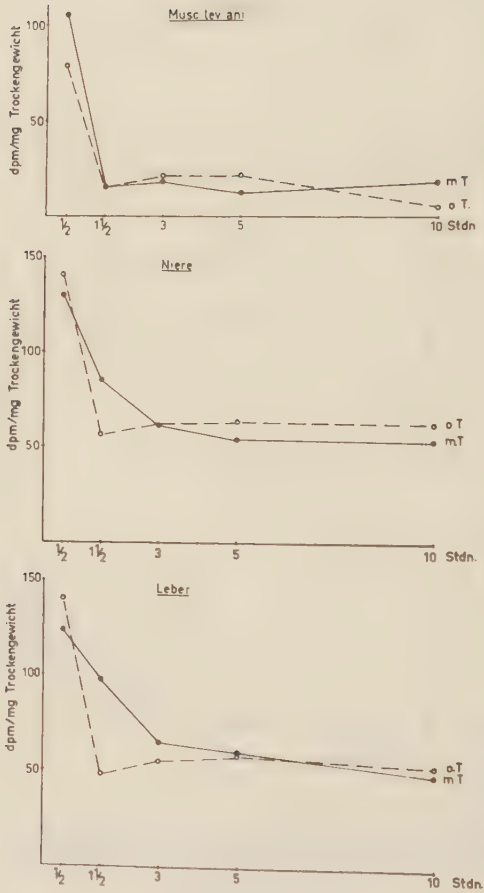


Abb. 6: siehe Abb. 4; Durchschnittsgewicht der eingesetzten Tiere 71 g; Zeitintervalle wie Abb. 5

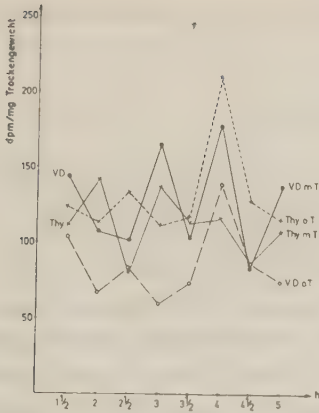
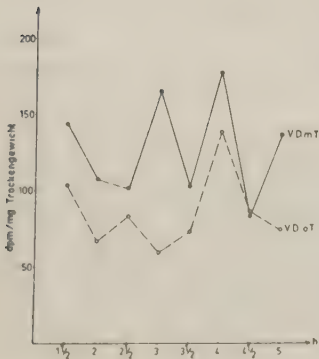
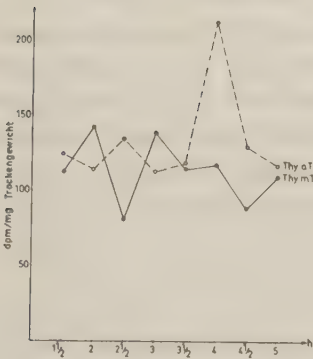


Abb. 7: siehe Abb. 3; Durchschnittsgewicht der Tiere 52 g; abweichende Zeitintervalle; eingesetzte Radioaktivität pro Tier $5,5 \mu\text{c}$; die Kurven für Vesikulardrüsen und Thymus sind einmal getrennt und einmal zusammen dargestellt.



2. Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in die RNA verschiedener Organe

a) Einfluß bei mehrtägiger Vorbehandlung

Bei vorsichtiger Interpretation der vorangegangenen Versuche ist eine Beeinflussung des Uridinstoffwechsels unter Testosteron zumindest bei Vesikulardrüsen und Thymus zu vermuten. In den nächsten Versuchen sollte nun studiert werden, ob die Ribonucleinsäure als eine der Uracil-haltigen Fraktionen von der veränderten Stoffwechsellage betroffen ist. Es wurde damit die Karlson'sche Theorie verfolgt, die besagt, daß Ecdyson und Hormone mit ähnlichem Wirkungsmechanismus primär am Genom angreifen und zu einer Aktivierung der messenger-RNA-Produktion führen. Als Meßergebnis müßte sich in diesem Fall eine vermehrte Inkorporation radioaktiv markierter Vorstufen in die RNA vorbehandelter Tiere finden. So berichteten Sekeris und Lang (1964) über eine vermehrte ³²P-Inkorporation in verschiedene RNA-Frak-tionen der Leber unter Cortisoleinfluß, Wicks und Kenney (1965) über eine vermehrte ³²P-Inkorporation in die Vesikulardrüsen-RNA unter Testosteroneinfluß. Bei früheren Vorversuchen wurde dagegen am hiesigen Institut nach Testosterongabe ein verminderter Einbau von Uridin-2-¹⁴C in die Vesikulardrüsen-RNA gefunden. Zur Sicherung dieses Effektes sollte nun der Uridineinbau in die RNA verschiedener Organe systematisch untersucht werden.

In einer ersten Versuchsserie wurden die Ratten 5 Tage mit Testosteron bzw. reinem Sesamöl vorbehandelt. Da die Vesikulardrüsen so klein sind, mußten mehrere Organe zur Extraktion der RNA gemeinsam verarbeitet werden, um auswertbare Ergebnisse bei Mengen- und Radioaktivitätsbestimmung der RNA zu erhalten. Wegen der hohen Kosten des ¹⁴C-Uridins wurden die Untersuchungen zunächst nur bei einer Sektionszeit (Zeit zwischen Uridininjektion und Tötung der Tiere) durchgeführt. Die Aufnahme von Zeitkurven ließ - von Organ

zu Organ etwas verschieden - während der ersten 5 Stunden die größte Beeinflußbarkeit des Uridinstoffwechsels vermuten. Da sich bei allen Tieren innerhalb der ersten Stunde der gleiche Radioaktivitätsanstieg bei vorbehandelten und unvorbehandelten Tieren zeigte, dürfte dies auf die plötzliche Überschwemmung des Organismus mit radioaktivem Uridin zurückzuführen sein. Es wurde daher für alle folgenden Versuche ein Zeitintervall von 3 Stunden zwischen Uridingabe und Sektion festgelegt.

Tabelle 3 enthält die gefundenen Werte. Davon sind einige Erwartungswerte. Nach 5 tägiger Vorbehandlung ist in jedem Fall die Gesamtmenge der RNA pro Vesikulardrüse wie auch die relative Menge bzw. "Konzentration" der RNA ($\mu\text{g RNA/mg Frischgewicht}$) angestiegen. Der Effekt bezüglich der Gesamt-RNA liegt zwischen + 100 % und + 300 %, der Effekt bezüglich der "Konzentration" liegt zwischen + 45 % und + 65 %. Überraschend war die Feststellung, daß von der RNA der Vesikulardrüsen nach Testosteronbehandlung weniger ^{14}C -Uridin(- 25 % bis - 80 %) aufgenommen wird als von der RNA unvorbehandelter Tiere.

Zum Vergleich wurden die entsprechenden Werte für Leber und Thymus ermittelt. Tabelle 4 enthält nur die "Konzentrationen" in $\mu\text{g RNA/mg Frischgewicht}$ und die Einbauraten von ^{14}C -Uridin in die RNA in $\text{dpm}/\mu\text{g RNA}$.

Ein Einfluß von Testosteron auf die "Konzentration" der RNA läßt sich bei Leber und Thymus nicht feststellen. Bei der Leber steigert Testosteron die Aufnahme von Uridin- $2\text{-}^{14}\text{C}$ in die RNA. Besonders betont sei die Tatsache, daß die RNA der Leber und des Thymus weniger Radioaktivität aufnimmt als die der Vesikulardrüsen.

Um zu überprüfen, ob eine Methylierung des radioaktiven Uridins zu Thymidin mit anschließendem Einbau in die DNA stattgefunden hatte, wurde eine Radioaktivitätsmessung der nach Trennung der Nucleinsäuren in 0,1 n NaOH aufgenommenen DNA durchgeführt. Bei allen Analysen lagen die Impulsraten der DNA nicht über der Impulsrate des "backgrounds". Daher wurde bei späteren Analysen

Tab. 3: Einfluß von Testosteron auf die RNA-Menge (absolut in μg und relativ in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht) und auf den Einbau von Uridin-2-14C in die RNA (dpm/ μg) der Vesikulardrüsen. Vorbehandlung der Tiere 5 Tage mit je 100 μg Testosteron bzw. reinem Sesamöl. Am 6. Tag Injektion von 4 μC Uridin-2-14C in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung. Sektion 3 Stunden nach Injektion von Uridin-2-14C.

V_o = Vesikulardrüsen ohne Testosteronbehandlung

V_m = Vesikulardrüsen mit Testosteronbehandlung

Mittl. Ge- wicht der Tiere		1. Versuch		2. Versuch	
		75 g (31 Tage alt)		60 g (30 Tage alt)	
		1. Portion	2. Portion	1. Portion	2. Portion
Zahl der Ve- sikulardrüsen	V_o	5	2	5	2
	V_m	3	2	3	2
Frischgew. der Vesikulardrü- sen in mg	V_o	61,34	36,68	52,14	27,33
	V_m	85,48	94,75	56,50	50,60
μg RNA ge- samt	V_o	244	144	206	91
	V_m	484	618	374	163
μg RNA/1 Ve- sikulardrüse	V_o	48,8	72,0	41,2	43,3
	V_m	161,3	309,0	124,6	81,5
Effekt in % bei μg RNA/1 Vesikulardrüse	V_m	+230	+329	+202	+88
μg RNA/ mg Frischge- wicht	V_o	3,97	3,92	3,95	3,32
	V_m	5,66	6,50	6,61	3,22
Effekt in % bei μg RNA/mg	V_m	+43	+66	+67	-
dpm/1 μg RNA	V_o	10,17	5,45	1,00	1,01
	V_m	7,82	1,09	0,38	0,37
Effekt in % bei dpm/1 μg RNA	V_m	-23	-80	-62	-63

Tab. 4: Einfluß von Testosteron auf die relative Menge bzw. "Konzentration" der RNA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht) und auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in die RNA von Leber und Thymus in $\text{dpm}/\mu\text{g}$ RNA. Vorbehandlung siehe Tab. 3. o = ohne Testosteronvorbehandlung, m = mit Testosteronvorbehandlung.

		1. Versuch		2. Versuch	
		Leber	Thymus	Leber	Thymus
Frischgew. der Organe in mg	o	72,82	78,95	67,35	66,05
	m	71,43	66,19	76,29	63,55
μg RNA/mg Frischgewicht	o	8,2	7,7	2,8(?)	7,4
	m	7,0	7,4	8,7	7,7
$\text{dpm}/\mu\text{g}$ RNA	o	0,48	0,01	0,33	0,30
	m	0,57	0,09	0,66	0,29

auf weitere Radioaktivitätsmessungen der DNA verzichtet. Diese Ergebnisse schließen nicht aus, daß der Weg der Umwandlung des applizierten ^{14}C -Uridins in Thymidin mit anschließendem Einbau in die DNA nicht doch in geringem Umfang beschritten wurde, jedoch kann angenommen werden, daß dieser Anteil am Stoffwechsel des Uridins im Rahmen der angewandten Versuchsanordnung prozentual ohne Bedeutung ist.

b) Initialer Einfluß

Bei den vorangegangenen Versuchen mit mehrtägig vorbehandelten Tieren wurde trotz einer signifikanten Vermehrung der RNA-Menge wider Erwarten eine verminderte spezifische Aktivität in der Vesikulardrüsen-RNA nach Testosteronvorbehandlung gefunden. Aufgrund folgender Überlegung ist es nicht ohne weiteres zulässig, diesen Effekt auf einen verminderten Einbau von ^{14}C -Uridin in die RNA zurückzuführen. Findet unter Testosteron eine vermehrte Inkorporation von ^{14}C -Uridin in die RNA statt, die prozentual hinter der RNA-Menge zurückbleibt, die sich bei ^{14}C -Uridininjektionen bei vorbehandelten Tieren gegenüber den Kontrollen schon angereichert hatte, so ergibt sich bei Bezug

der dpm auf $1 \mu\text{g}$ RNA eine verminderte spezifische Aktivität. Der gefundene "negative" Einbaueffekt wäre so lediglich relativ zu werten. Um bezüglich der vorhandenen RNA-Menge bei ^{14}C -Uridingabe die gleiche Startsituation bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen voraussetzen zu können, wurde in weiteren Versuchen unreifen Ratten am Versuchstag erst $1/2$ Stunde vor ^{14}C -Uridingabe $100 \mu\text{g}$ Testosteron injiziert. (Tab. 5).

Tab. 5: Einfluß von Testosteron auf die RNA-Menge (absolut in μg und relativ in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht) und auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in die RNA (dpm/ μg) der Vesikulardrüsen. Die Tiere erhielten am Versuchstag je $100 \mu\text{g}$ Testosteron bzw. reines Sesamöl und $1/2$ Stunde später $4,7 \mu\text{C}$ Uridin-2- ^{14}C in $0,2 \text{ ml}$ physiol. Kochsalzlösung. Sektion 3 Stunden nach Injektion von ^{14}C -Uridin. V_o = Vesikulardrüsen ohne Testosteronbehandlung, V_m = Vesikulardrüsen mit Testosteronbehandlung.

		1. Versuch	2. Versuch
Zahl der Tiere	V_o	10	10
	V_m	10	10
Frischgew. der Vesikulardrüsen in mg	V_o	118,56	104,85
	V_m	119,45	114,23
μg RNA gesamt	V_o	579	506
	V_m	680	528
μg RNA/mg Frischgewicht	V_o	4,88	6,85
	V_m	5,69	5,21
dpm/ μg RNA	V_o	3,33	6,85
	V_m	3,29	5,21

Bei diesen "Kurzzeitversuchen" läßt sich ein Einfluß von Testosteron auf die RNA-Menge nicht feststellen. Die Aufnahme von Uridin-2- ^{14}C ist in einem Fall bei vorbehandelten und unvorbehandelten Tieren gleich, in einem weiteren Versuch wie bei den vorangegangenen "Langzeitversuchen" bei vorbehandelten Tieren vermindert.

c) Zeitlicher Verlauf des Uridineinbaus in die Ribonucleinsäure

Da auch bei "Kurzzeitversuchen" kein vermehrter Einbau von ^{14}C -Uridin stattfand, wie bei einer vermehrten RNA-Synthese zu erwarten wäre, stellte sich die Frage, ob Testosteron nicht zusätzlich den "turnover" der RNA beeinflusst. Würde der "turnover" - etwa durch Stabilisierung der RNA unter Testosteroneinfluß - vermindert, so müßte sich in der ersten Zeit nach Uridingabe in der RNA eine verminderte spezifische Aktivität finden, wenn der Anteil der spezifischen Aktivität, der zu Lasten der erhöhten Synthese geht, diesen Effekt nicht kompensiert. Da bislang die Sektion der Tiere auf 3 Stunden nach ^{14}C -Uridingabe festgelegt worden war, ging die Dynamik des RNA-Stoffwechsels nicht in die Meßergebnisse ein. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch der Einbau von Uridin-2- ^{14}C in die RNA der Vesikulardrüsen über eine Zeit von 40 Stunden verfolgt (Abb. 8).

Der Verlauf der Kurven überrascht. Es dürfte unwahrscheinlich sein, daß der unterschiedliche Verlauf der beiden Kurven Testosteron-vorbehandelter Tiere und der Kontrollen einfach auf statistischen Schwankungen des biologischen Materials zurückzuführen ist. Wenn man berücksichtigt, daß die Kurve für die Kontrolltiere, die während der Zeitspanne von 15 bis 40 Stunden ansteigt, sicherlich zu einem späteren Zeitpunkt wieder abfällt, so ergibt sich die interessante Tatsache, daß beide Kurven einen ähnlichen Verlauf nehmen mit dem Unterschied, daß bei den Testosteron-vorbehandelten Tieren ein schnellerer Wechsel zwischen Anstiegs- und Abstiegsphase stattfindet.

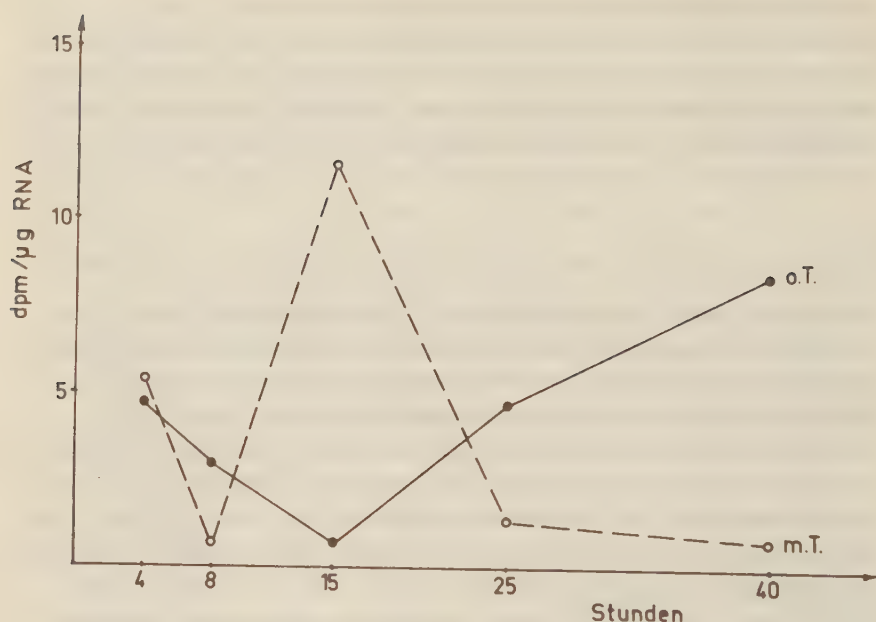


Abb. 8: Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf des ^{14}C -Uridineinbaus in die RNA der Vesikulardrüsen. Vorbehandlung der Tiere 5 Tage (Sektion nach 4, 8 und 15 Stunden), 6 Tage (Sektion nach 25 Stunden) und 7 Tage (Sektion nach 40 Stunden) mit je $100\text{ }\mu\text{g}$ Testosteron bzw. reinem Sesamöl. Am Versuchstag Injektion von $3,9\text{ }\mu\text{C}$ Uridin-2- ^{14}C in $0,2\text{ ml}$ physiol. Kochsalzlösung. Jeder Punkt der Kurve ist durch 2 Tiere repräsentiert.

3. Testosteronwirkung auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in verschiedene Ribonucleinsäure-Fractionen

Die Ribonucleinsäure kann nach cellulärer Lokalisation und biologischer Funktion in 3 Gruppen eingeteilt werden: 1. in die messenger-RNA (m-RNA), die in Basenzusammensetzung und Sequenz große Ähnlichkeit mit bestimmten Abschnitten der DNA, an der sie gebildet wird, aufweist. Sie wandert vom Kern ins Cytoplasma, um sich dort mit Ribosomen zu Polysomen zu verbinden und als Matrize für die verschiedenen Eiweiße zu dienen; 2. in die ribosomale RNA (r-RNA), die Bestandteil und Strukturbildner der Ribosomen ist. Einzelheiten ihrer Funktion sind noch nicht bekannt; 3. in die transfer RNA (t-RNA), die im Cytoplasma die einzelnen Aminosäuren zum Ort der Eiweißsynthese transportiert. Die Ribonucleinsäuren unterscheiden sich zudem in ihren chemischen (Basenzusammensetzungen) und physikalischen (Molekulargewicht) Eigenschaften.

Sollte das Konzept der hormonellen Genaktivierung, wie es für Testosteron diskutiert wird, zutreffen, so ist nach dem Jakob-Monod'schen Modell zu erwarten, daß nach Applikation des Hormons bestimmte Repressoren der DNA inaktiviert werden, sodaß es zu einer Steigerung der m-RNA-Synthese kommt. Wicks et al. konnten dies für die Bildung der RNA in den Vesikulardrüsen nicht feststellen, vielmehr kamen sie aufgrund von Basenanalysen zu dem Schluß, daß Testosteron die de-novo-Synthese aller 3 Arten von RNA fördert. Für diese Reaktionsweise stellten Drews und Wacker (1966) ein Modell zur Diskussion, in dem in Erfolgsorganen die DNA-abhängige RNA-Polymerase selbst unter Repressoreinfluß steht, sodaß auf einen hormonellen Stimulus nach Derepression der Polymerase das gesamte Genom der Zelle quantitativ reagiert. Untersuchungen von Kidson und Kirby (1965) zeigten jedoch, daß die Steigerung der RNA-Synthese nach Applikation verschiedener Hormone in der Leber ganz spezifischen Charakter hat, was darauf hindeutet, daß die Basenzusammensetzung der RNA unter Hormoneinfluß doch verändert sein dürfte. Sollte dies auch auf die Vesikulardrüsen zutreffen, so wäre damit eine Erklärung möglich, wie

die sich widersprechenden Befunde zu korrelieren sind, daß nämlich einmal die RNA der Vesikulardrüsen unter Testosteroneinfluß vermehrt ^{32}P (Wicks et al., 1965) und Cytidin-2- ^{14}C (Fujii und Vilee, 1968) einbaut, jedoch vermindert Uridin-2- ^{14}C .

Zur Sicherung des verminderten Einbaus von ^{14}C -Uridin in die RNA der Vesikulardrüsen Testosteron-vorbehandelter Tiere wurde bei gleicher Vorbehandlung der Tiere die RNA mit einem anderen Verfahren extrahiert. Da bislang nur der Einfluß von Testosteron auf den Einbau von ^{14}C -Uridin in die Gesamtnucleinsäuren untersucht worden war, sollte gleichzeitig eine weitere Fraktionierung der RNA entsprechend ihrer Funktion bzw. Lokalisation getroffen werden, um zu sehen, ob der gefundene Effekt in allen RNA-Fraktionen zu beobachten war, oder eventuell auf eine der Fraktionen beschränkt ist. Es wurde ein Verfahren von Georgiev und Samarina (1963) angewandt. Wicks und Kenney (1965) geben für die einzelnen Fraktionen in den Vesikulardrüsen nach Zuckergradientenzentrifugation und Basenanalysen folgende RNA-Arten an: 0°C Fraktion: cytoplasmatische RNA, die sich aus t-RNA, r-RNA (28s und 18s) und wechselnden Anteilen degradierter hochmolekularer RNA zusammensetzt. 45°C - und 85°C -Fraktion: DNA-like RNA (10s bis 50s) und hochmolekulare Vorstufen der r-RNA (45s). Anm.: Sibatani et al. (1962) konnten zeigen, daß der größte Teil der schnell-markierten RNA bei niedrigen Temperaturen an Kernkomponenten gebunden bleibt.

a) Einfluß bei mehrtägiger Vorbehandlung

In Analogie zu den vorangegangenen Versuchen wurde zuerst der Einfluß von Testosteron auf den ^{14}C -Uridineinbau in verschiedene RNA-Fraktionen bei mehrtägig vorbehandelten Tieren untersucht, um zu sehen, ob Testosteron bei "Langzeit"- und "Kurzzeitversuchen" gleichsinnig wirkt (Tab. 6). Nach Clever und Karlson (1960) ist die Aktivierung einzelner Gene auch von der Menge des zugeführten Hormons abhängig.

Tab. 6: Einfluß von Testosteron auf die RNA-Menge (absolut in μg und relativ in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht) und auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in verschiedene RNA-Fractionen (0°C -, 45°C - und 85°C -Fraktion; $\text{dpm}/\mu\text{g}$) der Vesikulardrüsen. Vorbehandlung der Tiere 5 Tage mit je $100 \mu\text{g}$ Testosteron bzw. reinem Sesamöl. Am Versuchstag Injektion von $4,7 \mu\text{C}$ Uridin-2- ^{14}C in $0,2 \text{ ml}$ physiologischer Kochsalzlösung.

V_o = Vesikulardrüsen ohne Testosteronvorbehandlung

V_m = Vesikulardrüsen mit Testosteronvorbehandlung

		1. Versuch	2. Versuch
Zahl der Tiere	V_o	13	13
	V_m	7	7
Frischgewicht der Vesikulardrüsen in mg	V_o	152,43	144,77
	V_m	165,10	159,13
$\mu\text{g RNA gesamt}$	$0^\circ V_o$	210,0	429,0
	V_m	324,0	544,5
	$45^\circ V_o$	55,0	93,5
	V_m	-	253,0
	$85^\circ V_o$	145,7	110,0
	V_m	219,8	192,5
	$0^\circ V_o$	16,15	33,00
	V_m	46,28	77,78
$\mu\text{g RNA/1 Vesikulardrüse}$	$45^\circ V_o$	4,23	7,19
	V_m	-	36,14
	$85^\circ V_o$	11,21	8,46
	V_m	31,40	27,50

		1. Versuch	2. Versuch
$\mu\text{g RNA/mg}$ Frischgewicht	0° V_O	1,38	2,96
	V_m	1,96(+29%)	3,42(+17%)
	45° V_O	0,36	0,99
	V_m	--	1,59(+60%)
	85° V_O	0,96	0,76
	V_m	1,33(+38%)	1,21(+59%)
dpm/ $1\mu\text{g RNA}$	0° V_O	4,66	1,68
	V_m	3,66	1,22
	45° V_O	4,65	2,48
	V_m	--	0,98
	85° V_O	7,18	5,64
	V_m	2,50(-65%)	2,48(-56%)

Die Ergebnisse bestätigen, daß nach mehrtägiger Testosteronvorbehandlung sowohl cytoplasmatische-, als auch besonders Kern-RNA vermehrt sind. Die spezifische Aktivität ist in allen Fraktionen erniedrigt. Dabei ist auffällig, daß besonders die 85°C -Fraktion betroffen ist. Hier liegen die Werte der vorbehandelten Tiere gegenüber den Kontrollen um 55% bis 65% tiefer.

b) Initialer Einfluß

Nach Extraktion der Gesamtnucleinsäuren war bisher bei den "Kurzzeitversuchen" im Unterschied zu den "Langzeitversuchen" keine sichere Aussage über das Verhältnis der

spezifischen Aktivitäten bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen zu machen. Sollten sich bei "Kurzzeitversuchen" nach Testosteron dieselben Wirkungsmechanismen wie bei "Langzeitversuchen" abspielen, so war nach den bisherigen Ergebnissen der "Langzeitversuche" zu erwarten, daß der größte Anteil der Gesamt-Aktivität nach Fraktionierung der RNA in der mengenmäßig kleinen Kern-RNA-Fraktion wiederzufinden war, sodaß sich bei Bezug der dpm auf die Kern-RNA-Menge eher ein Einfluß des Testosterons bemerkbar machen müßte als bei Bezug der dpm auf die Gesamt-RNA-Menge (Tab. 7).

Ein Einfluß auf die RNA-Menge ist bei diesen "Kurzzeitversuchen" nicht zu erkennen. Ebenso ist in 0°C - und 45°C -Fraktion kein in eine bestimmte Richtung weisender Effekt des Testosterons auf den Einbau von 14C -Uridin in die RNA festzustellen. Eine deutliche Hemmung zeigt sich jedoch bei allen drei Versuchen in der 85°C -Fraktion. Dies entsprach den Erwartungen, in dieser Fraktion am ehesten einen frühzeitigen Einfluß des Testosterons zu erfassen. Wegen der Zusammenfassung vieler Organe ist es allerdings nicht möglich, einen Signifikanztest zu erheben.

Tab. 7: Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Uridin-2-14C in verschiedene RNA-Fractionen (dpm/ μ g) der Vesikulardrüsen. Am Versuchstag erhielten die Tiere je 100 μ g Testosteron bzw. reines Sesamöl. 1/2 Stunde später Injektion von 4,7 μ c Uridin-2-14C in 0,2 ml physiologischer NaCl-Lösung. Sektion 3 Stunden nach Uridingabe.

V_o = Vesikulardrüsen ohne Testosteronvorbehandlung

V_m = Vesikulardrüsen mit Testosteronvorbehandlung

		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Zahl der Tiere	V_o	11	11	11
	V_m	11	11	11
Frischgewicht der Vesikulardrüsen in mg	V_o	114,85	114,95	112,33
	V_m	132,49	129,23	127,20
μ g RNA gesamt	$0^\circ V_o$	313,5	316,8	353,1
	V_m	323,4	346,5	429,0
	$45^\circ V_o$	63,3	110,0	55,0
	V_m	74,2	96,3	41,2
	$85^\circ V_o$	121,0	156,8	63,2
	V_m	165,0	123,8	19,2(?)
μ g RNA/mg Frischgewicht	$0^\circ V_o$	2,73	2,75	3,14
	V_m	2,44	2,68	3,37
	$45^\circ V_o$	0,55	0,95	0,49
	V_m	0,56	0,75	0,32
	$85^\circ V_o$	1,05	1,36	0,51
	V_m	1,24	0,96	0,15
dpm/ μ g RNA	$0^\circ V_o$	3,19	2,52	3,51
	V_m	1,96	2,51	3,51
	$45^\circ V_o$	6,60	4,20	4,30
	V_m	3,64	6,24	3,28
	$85^\circ V_o$	10,66	9,58	7,82
	V_m	3,94(-74%)	6,08(-37%)	4,44(-43%)

C. Diskussion

Bei Vergleich der graphischen Darstellungen, die den zeitlichen Verlauf der ^{14}C -Aufnahme in verschiedene Rattenorgane nach Injektion von Uridin- $2\text{-}^{14}\text{C}$ beschreiben, zeigt sich, daß zunächst bei allen Organen innerhalb der ersten Stunde ein sprunghafter Anstieg der spezifischen Aktivitäten sowohl bei vorbehandelten als auch bei den Kontrolltieren erfolgt. Dies ist wahrscheinlich auf die plötzliche Überschwemmung des Blutes mit markiertem Uridin zurückzuführen, denn bei Leber, Niere und Muskulus levator ani fallen die Werte anschließend wieder mehr oder weniger kontinuierlich ab. Der Verlauf der Kurven bei diesen 3 Organen läßt keine Besonderheiten im Gesamturidinstoffwechsel vermuten. Differenzen bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen sind schwer zu beurteilen, da sie innerhalb der Fehlerbreite der Analysentechnik und der Schwankungen des biologischen Materials liegen. Nach einigen Stunden scheinen die Aktivitäten in den Organen vorbehandelter Tiere jedoch etwas tiefer zu liegen. Auffällig ist, daß die spezifischen Aktivitäten bei Muskulus levator ani, der ein Erfolgsorgan für die anabole Wirkung des Testosterons ist (Wainman und Shipounoff, 1941), insgesamt sehr niedrig liegen.

Im Gegensatz zu den einheitlichen Kurvenbildern dieser 3 Organe deuten die Bilder bei Vesikulardrüsen und Thymus doch auf ein besonderes Verhalten bezüglich des Uridinstoffwechsels hin. Bei den unvorbehandelten Tieren folgt nach dem initialen Anstieg der spezifischen Aktivität ein zweites Maximum, das bei etwa 3 Stunden liegt. Der Kurvenverlauf beider Organe erfolgt genau parallel, wobei die spezifischen Aktivitäten des Thymus um 30 % bis 50 % über denen der Vesikulardrüsen liegen. Bei den hormonbehandelten Tieren unterliegt der ^{14}C -Gehalt bei Thymus und Vesikulardrüsen außerordentlichen Schwankungen. Dies lediglich auf Mängel der Analysentechnik zurückzuführen, ist nicht befriedigend, da einmal eine Doppelanalyse desselben Thymus gut übereinstimmende Werte ergab, zum anderen der gleichmäßige Kurvenverlauf bei Leber, Niere und Muskulus levator ani und die reproduzierbaren Verhältnisse bei Vesikulardrüsen und Thymus unvorbe-

handelter Tiere für die Gültigkeit auch dieser Kurven spricht. Der sich scheinbar widersprechende Kurvenverlauf der Vesikular-drüsen in Abb. 3 und Abb. 5 erfährt durch Abb. 7 eine gewisse Erklärung, da hier gezeigt wird, daß der ^{14}C -Gehalt in halbstündigen Abständen großen Schwankungen unterliegt. Es scheint, daß sich die Aktivitäten hier bei Vesikulardrüsen und Thymus periodisch ändern, wobei Maxima des Aktivitätsgehaltes in den Vesikular-drüsen Minima des Aktivitätsgehaltes im Thymus entsprechen. Insgesamt liegen im Unterschied zu den Kontrolltieren die spezifischen Aktivitäten des Thymus niedriger als die der Vesikular-drüsen. Diese Beobachtung würde die Vermutung einiger Autoren stützen, daß zwischen Gonaden und Thymus ein gewisser Antagonismus besteht. So konnte gezeigt werden, daß höhere Dosen von Testosteron und Oestradiol eine Involution des Thymus bewirken (Ammon und Dirscherl, 1960). Der Thymus könnte beispielsweise als Reservoir für Nucleotide und Aminosäuren dienen, die bei Bedarf schnell in die entsprechenden Organe transferiert werden. Aufgrund der angewandten Versuchsanordnung lassen sich jedoch keine differenzierten Aussagen machen, da außer dem ^{14}C -Gehalt der RNA Schwankungen des Nucleotidpools, Wiederverwertung radioaktiver Nucleotide und radioaktive Abbauprodukte in die ^{14}C -Gesamtbestimmung eingehen.

Die Untersuchung der RNA 30 Tage alter männlicher Ratten 3 Stunden nach ^{14}C -Uridininjektion ergab, daß die spezifischen Aktivitäten bei Leber und Thymus nach Testosteronvorbehandlung leicht erhöht waren, in den Vesikulardrüsen dagegen erniedrigt. Eine Fraktionierung der Vesikulardrüsen-RNA zeigte, daß dieser Effekt signifikant in der 85°C -Fraktion auftrat, die "DNA-like" RNA und hochmolekulare Vorstufen der ribosomalen RNA enthält, und zwar sowohl bei "Langzeit-" als auch bei "Kurzzeitversuchen". Die hier unter Testosteron gefundene verminderte Inkorporation von Uridin-2- ^{14}C steht auf den ersten Blick in auffälligem Gegensatz zu dem von anderen Autoren gefundenen vermehrten Einbau von ^{32}P in die Vesikulardrüsen-RNA kastrierter Ratten (Wicks et al., 1965) und Cytidin-2- ^{14}C in die Vesikulardrüsen-RNA unreifer Ratten (Fujii und Vिलlee, 1968). Die Ergebnisse dieser Autoren wie

auch die eigenen Ergebnisse bezüglich der RNA-Menge, die nach 5-tägiger Vorbehandlung um 45 % bis 65 % gestiegen war, lassen ohne weiteres die Interpretation einer Stimulation der RNA-Synthese unter Testosteron zu.

Obwohl bei dem derzeitigen Stand der Untersuchungen noch viele Fragen des Uridin- und RNA-Stoffwechsels unter Testosteroneinfluß ungeklärt sind, soll durch einige theoretische Überlegungen der Versuch einer Deutung der verminderten Inkorporation von Uridin-2-¹⁴C in die Vesikulardrüsen-RNA gemacht werden.

1. Kommt es unter dem Einfluß von Testosteron nicht nur zu einer Synthesesteigerung der RNA, sondern auch zu einer Aktivierung der Nucleotid-de-novo-Synthese aus inaktiven Vorstufen, sodaß die Höhe des endogenen "Nucleotidpools" steigt, so wird die spezifische Aktivität zugeführter markierter RNA-Bausteine verringert. Dies gilt allerdings nur, wenn Testosteron den Bausteinzufluß vom extracellulären in den intracellulären Raum als Folge einer Permeabilitätserhöhung nicht ebenfalls steigert. Eine derartige Verringerung der spezifischen Aktivität der RNA-Bausteine, insbesondere der von UTP, dem direkten Substrat der RNA (Weiss, 1960) müßte sich auch in der spezifischen Aktivität der RNA widerspiegeln. In diesem Falle läge keine Einbauhemmung von ¹⁴C-Uridin in die RNA vor, sondern ein relativer Mangel an radioaktiv-markierten Vorstufen. Versuche von Kochakian und Hill (1966) mit Nierengewebe kastrierter, Testosteron-behandelter Ratten zeigten nach Gabe von markierter Orotsäure als Vorstufe der Pyrimidinsynthese, daß Testosteron den Stoffwechsel Uracil-haltiger Bausteine zugunsten von UTP stark anabol beeinflußt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Feigelson und Feigelson (1962) bei Versuchen mit Rattenleber unter Cortisoleinfluß: sie fanden eine vermehrte Biosynthese von Purinen aus Glycin-2-¹⁴C.
2. Selbst bei Konstanz des "Nucleotidpools" in der Zelle und unveränderter Basenzusammensetzung der unter Testosteron gebildeten RNA besteht eine weitere Möglichkeit, den erniedrigten ¹⁴C-Uridingehalt in der Vesikulardrüsen-RNA zu deuten:

Induziert Testosteron die Bildung einer stabileren RNA im Sinne einer Erhöhung der biologischen Halbwertszeit, so müßte in diesem Falle die spezifische Aktivität der RNA vorbehandelter Tiere gegenüber den Kontrollen langsamer ansteigen und zu einem späteren Zeitpunkt als dem gewählten erhöht sein. Abb. 8 könnte in diesem Sinne gedeutet werden. Es ist jedoch zu betonen, daß die einzelnen RNA-Fraktionen unterschiedlich schnell markiert werden entsprechend ihrer verschiedenen biologischen Funktion (Samarina, 1964 und Scherrer et al., 1963). Hier kann die biologische Halbwertszeit nur als mittlere Lebensdauer aller Arten von Ribonucleinsäure verstanden werden. Liao et al. (1966) diskutieren beispielsweise die Möglichkeit, daß eine vermehrte Synthese von Ribonucleoproteinpartikeln die m-RNA vor dem schnellen Zerfall schützt. Da die m-RNA eine hohe Rate an Adenin und Uracil enthält (Wicks et al., 1965), müßte bei Erhöhung ihrer Lebensdauer nach Gabe von Uridin-2- ^{14}C zu Beginn eine verminderte spezifische Aktivität in der RNA gefunden werden. Es liegen jedoch noch keine eindeutigen Untersuchungen über die biologische Halbwertszeit der m-RNA im Säugetierorganismus vor.

3. Neuere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die Steigerung der RNA-Synthese nach Gabe von Hormonen spezifischen Charakter hat. Kidson und Kirby (1965) konnten zeigen, daß unter bestimmten physiologischen Bedingungen wie Hungerzustand, Cortisol-, Insulin- und Thyroxinwirkung verschiedene, reproduzierbare Verteilungsmuster der RNA vorliegen. Pogo et al. (1967) weisen ebenfalls aufgrund von Basenanalysen der RNA, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen in vitro gebildet wurde, darauf hin, daß das Verhältnis von ^{14}C -Uridin und ^{14}C -Guanin zu den anderen Basen ein empfindlicher Index für die Synthese spezifischer RNA ist. Legt man das Jakob-Monod'sche Modell zugrunde, daß jeweils eine an bestimmten Strukturgenen gebildete m-RNA Matrizenfunktion für die Synthese der verschiedenen Proteine hat, so liegt die Vorstellung nahe, daß auch unter Testosteron eine RNA mit spezifischer Basenzusammensetzung gebildet wird. Dazu konnten Liao und Lin (1966

und 1967) zeigen, daß Androgene in vivo selektiv eine DNA-Region in der Prostata aktivieren. Diese Region hat eine hohe Desoxycytidin-Desoxyguanosin-Sequenz, wonach die an dieser Region gebildete RNA reich an Guanin und Cytosin, also dem Charakteristikum der ribosomalen- und transfer RNA ist.

Auf der Ebene der Proteinsynthese sind in diesem Zusammenhang die Befunde von Kochakian (1965) aufschlußreich. Kochakian findet bei kastrierten Meerschweinchen nach Gabe von Testosteron einen stark erhöhten Einbau einer Reihe von Aminosäuren - entsprechend der Erhöhung der Proteinbiosynthese - in die Proteine der Vesikulardrüsen, jedoch unveränderten bis leicht erniedrigten Einbau von Phenylalanin und Tyrosin. Der Basencode der m-RNA für Phenylalanin ist UUU, der für Tyrosin UAU. Wenn die beiden erwähnten Aminosäuren vermindert oder wenigstens nicht vermehrt gegenüber den übrigen Aminosäuren in die Proteine eingebaut werden, so kann man rückschließend annehmen, daß die Matrizen-RNA für diese Proteine insgesamt weniger Uracil enthält.

Die in diesem dritten Punkt aufgeführten Befunde anderer Autoren lassen sich unseren Ergebnissen besonders gut zuordnen, zumal der verminderte Einbau von Uridin-2-¹⁴C besonders in der 85°C-Fraktion gefunden wird, die "DNA-like" RNA und vor allem Vorstufen der ribosomalen RNA enthält. Sowohl eine vermehrte Synthese spezifischer, weniger Uracil-haltiger "DNA-like" RNA als auch eine vermehrte Synthese ribosomaler RNA, die per se weniger Uracil enthält als die "DNA like" RNA, lassen sich somit mit einer verminderten spezifischen Aktivität der RNA nach ¹⁴C-Uridingabe unter Testosteron vereinbaren. Das zeigt, daß man auf alle Fälle aus dem vermehrten oder verminderten Einbau eines einzelnen RNA-Bausteines keine Rückschlüsse auf die Beeinflussung der RNA-Synthese als Ganzes schließen kann.

Welcher der diskutierten Mechanismen primär für den verminderten Einbau von Uridin in die Vesikulardrüsen-RNA verantwortlich ist, läßt sich bislang aus unseren Versuchen und bei Vergleich der Literatur noch nicht entscheiden. Es spricht vieles dafür, daß

die neugebildete RNA eine Basenzusammensetzung mit relativ wenig Uridin enthält. Von den beiden anderen Deutungen für die Verminderung der spezifischen Aktivität der RNA ist die nächstwahrscheinliche die einer verstärkten de-novo-Synthese Uracilhaltiger Bausteine aus inaktiven Vorstufen, die zu einer verminderten spezifischen Aktivität der RNA-Bausteine und damit auch der aus ihr synthetisierten RNA führen muß. Eine solche verstärkte de-novo-Synthese würde entweder eine unmittelbare Aktivierung oder eine Induktion der daran beteiligten Enzyme durch Testosteron voraussetzen.

Daneben ist an einen multilateralen Angriff der Androgene zu denken, wo neben einer Aktivierung der RNA-Synthese im Kern eine gleichzeitige Aktivierung der Enzyme des Nucleotidstoffwechsels im Cytoplasma zu der beobachteten Verminderung der spezifischen Aktivität der Vesikulardrüsen-RNA führt. Auch diese Möglichkeit wurde wiederholt in den letzten Jahren aufgrund von Untersuchungsergebnissen des hiesigen Instituts und anderer Arbeitsgruppen diskutiert.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der ^{14}C -Aufnahme in verschiedene Organe 30 Tage alter männlicher Ratten nach Gabe von Uridin- ^{14}C studiert. Hierzu wurde den Tieren über eine Periode von 5 Tagen je $100\text{ }\mu\text{g}$ Testosteron in $0,2\text{ ml}$ Sesamöl bzw. reines Sesamöl (Kontrollen) subkutan injiziert. Bei Musculus levator ani, Niere und Leber verlaufen die spezifischen Aktivitäten (dpm/mg Organtrockengewicht) bei vorbehandelten- und Kontrolltieren über ein initiales Maximum und fallen dann kontinuierlich ab. Differenzen sind kaum zu beobachten. Die Aktivitäten der Vesikulardrüsen liegen bei den Kontrollen tiefer als die des Thymus, bei Testosteron-behandelten Tieren höher. Bestimmung der Aktivitäten dieser beiden Organe in halbstündigen Abständen nach ^{14}C -Uridininjektion führten zu dem überraschenden Ergebnis, daß sich in den Vesikulardrüsen und im Thymus die Aktivitäten unter Testosteroneinfluß anscheinend periodisch ändern. Hierbei entsprechen Maxima des Aktivitätsgehaltes in den Vesikulardrüsen Minima des Aktivitätsgehaltes im Thymus. Aufgrund des Kurvenbildes wird auf die Möglichkeit eines Antagonismus zwischen Vesikulardrüsen und Thymus hingewiesen.

Der Einbau von Uridin- ^{14}C in die Gesamt-RNA war unter Testosteron in Leber und Thymus leicht erhöht, in den Vesikulardrüsen erniedrigt. Fraktionierung der Vesikulardrüsen-RNA nach Georgiev zeigte sowohl bei 5-tägiger Vorbehandlung als auch bei einmaliger Testosterongabe eine halbe Stunde vor ^{14}C -Uridingabe in der 85°C -Fraktion 3 Stunden nach Uridingabe signifikant erniedrigte spezifische Aktivitäten gegenüber den Kontrollen. Es wurde diskutiert, daß dieser Effekt auf einem relativen Mangel an aktiven RNA-Bausteinen bei vermehrter Synthese inaktiver RNA-Vorstufen, auf einer Erhöhung der biologischen Halbwertszeit der RNA oder auf einer unter Testosteron gebildeten spezifischen RNA mit abweichender Basenzusammensetzung beruht. Daneben ist an einen multilateralen Angriff des Testosterons gedacht.

Literaturverzeichnis

- 1) Ammon, R. und W. Dirscherl Fermente, Hormone, Vitamine, Thieme, Stuttgart II, 308 (1960)
- 2) Beermann, U. Chromosoma 5, 139 (1952)
- 3) Changeux, J.P. In Karlson: Mechanisms of Hormone Action, Thieme, Stuttgart 36 (1965)
- 4) Clever, U. and P. Karlson Exp. Cell. Res. 20, 623 (1960)
- 5) Drews, J. und A. Wacker unveröffentlichter Vortrag 1966
- 6) Ebouß-Bouis, D., A.M.Chambaut, P.Volfin and H.Clauser Nature 199, 1183 (1963)
- 7) Feigelson, M., P.R. Gross and P. Feigelson Biochem. Biophys. Acta 55, 495 (1962)
- 8) Ferguson, L.A. and I.G.Wool Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 529 (1962)
- 9) Fujii, T. and C.A.Villee Endocrinology 82, 463 (1968)
- 10) Georgiev, G.P., O.P. Samarina, M.I. Lerman, M.N. Smirnov and A.N. Severtzov Nature 200, 1291 (1963)
- 11) Jakob, F. and J. Monod J. Molec. Biol. 3, 318 (1961)
- 12) Karlson, P. Dtsch.med.Wschr. 86, 668 (1961)
Perspect. Biol.Med. 6, 203 (1963)
- 13) Kidson, C. and S. Kirby Nature 203, 599 (1965)
- 14) Kipnis, D.M. and M.W.Noall Biochim. Biophys. Acta 28, 226 (1958)

- 15) Knox, W.E. and V.H. Auerbach
J.Biol. Chem. 214, 307 (1955)
- 16) Kochakian, C.D.
In Karlson: Mechanisms of Hormone Action, Thieme, Stuttgart 192 (1965)
- 17) Kochakian, C.D. and J.Hill
Biochem. 5, 1996 (1966)
- 18) Levine, R. and M.Goldstein
Rec. Progr. Hormone Res. 11, 343 (1955)
- 19) Liao, S., A.H. Lin and R.W. Barton
J. Biol. Chem. 241, 3869 (1966)
- 20) Liao, S. and A.H. Lin
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 57, 379 (1967)
- 21) Mosebach, K.-O. und T.Engels
Hoppe Seylers Ztschr. f. Physiol. Chemie 345, 111 (1966)
- 22) Pogo, A.O., V.C. Littau, V.G.Allfrey and A.E.Mirsky
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 57, 743 (1967)
- 23) Räsänen, T.
Acta endocr. 37, 153 (1961)
- 24) Rall, T.W., E.W.Sutherland and J. Berthet
J.Biol.Chem. 224, 463 (1957)
- 25) Samarina, O.P.
Biochim. Biophys. Acta 91, 688 (1964)
- 26) Scherrer, K., H.Lathan and J.E. Darnell
Proc. Nat.Acad.Sci.U.S. 49, 240 (1963)
- 27) Schmidt, G. and S.J. Thannhauser
J.Biol. Chem. 161, 83 (1945)
- 28) Schöniger, W.
Mikrochim. Acta (Wien) 1, 123 (1955)
- 29) Sekeris, C.E. and N. Lang
Life Sci. 3, 169 (1964)
- 30) Sibatani, A., S.R.Dekloet, V.G.Allfrey and A.E.Mirsky
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 48, 471 (1962)

Lebenslauf

Am 29. Dezember 1942 wurde ich als Tochter des Professors Dr. rer. nat. Herbert Jäger und seiner Frau Carolina Jäger geborene Mathes, in Köln geboren. 1949 bis 1953 besuchte ich in Bonn die Volksschule, von 1953 bis 1962 die Clara-Schumann-Schule, wo ich im Frühjahr 1962 das Abitur bestand. Von 1962 bis 1968 studierte ich an der Universität Bonn Medizin und legte hier am 23.4.1963 die naturwissenschaftliche, am 24.4.1965 die ärztliche Vorprüfung und am 10.7.1968 die ärztliche Prüfung ab.

